

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ  
КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ ДЛЯ РЕШЕНИЯ  
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ И ПРИКЛАДНЫХ ПРОБЛЕМ  
IDENTIFICATION OF CULTIVATED PLANT GENETIC DIVERSITY AND  
CROP WILD RELATIVES FOR SOLVING FUNDAMENTAL AND APPLIED  
PROBLEMS

УДК 577.152.193: 632.938

DOI:10.30901/2227-8834-2015-2-225-236

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО АНИОННУЮ  
ПЕРОКСИДАЗУ ПШЕНИЦЫ

И. В. Максимов, Г. Ф. Бурханова, О. И. Кузьмина, В. А. Вахитов

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,  
Уфа, Россия, e-mail: maksimov@ufaras.ru

Реферат

**Актуальность.** В геномах растений пероксидазы представлены десятками изоформ и, соответственно, десятками генов. Физиологические функции пероксидаз хорошо известны. Однако взаимодействие путей реализации генетической составляющей и структуры белковой части ее молекулы и последующее проявление чувствительности к воздействию стрессовых факторов растениями пока остаются слабо изученными. **Материалы и методы.** Проводили анализ гомологичности структуры фрагмента гена TC151917 (код доступа AK333699.1) пероксидазы *Triticum aestivum* L. у разных видов пшениц. **Результаты и выводы.** Выявлена максимальная гомология данного участка гена анионной пероксидазы *T. aestivum* с таковым у *T. compactum* Host (97,1%) и минимальная с *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. (94,1%). Сравнительный анализ просеквенированного фрагмента гена пероксидазы пшеницы TC151917 с данными международного генбанка других видов семейства Poaceae Barnhart показал наибольшую ее гомологию с пероксидазами ячменя *Hordeum vulgare* L. (AK249487.1 – 93% и AK249784.1 – 90%), риса *Oryza sativa* L. (D84400 – 82%, BN000655 – 82% и B14481 – 80%), сорго *Sorghum bicolor* (L.) Moench (XM\_002447101.1 – 80%) и кукурузы *Zea mays* L. (NM\_001147217.1 – 79% и EU974071.1 – 78%). Таким образом, подобные пероксидазы у родственных видов растений можно выделить в отдельный кластер полисахарид-специфичных изопероксидаз.

**Ключевые слова:** виды пшениц и эгилопс, ген пероксидазы, полиморфизм.

## ANIONIC PEROXIDASE GENE POLYMORPHISM IN WHEAT

I. V. Maksimov, G. F. Burkhanova, O. I. Kuzmina, V. A. Vakhitov

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center of Russian Academy of Sciences,  
Ufa, Russia, e-mail: [maksimov@ufaras.ru](mailto:maksimov@ufaras.ru)

### Abstract

**Background:** A great number of peroxidase genes are present in higher plants. Plants contain multiple isoforms of peroxidases, which respond to stresses in different or similar manner. Peroxidase enzymes and their encoding are important for plant defense against various biotic stresses including pathogen infection. Little is known about their organization and evolution in plants. **Materials and methods:** Identification, sequencing and phylogenetic comparison of gene fragment TC151917 (A333699.1) were performed in different wheat species. **Results:** The results postulated a close genetic proximity of the peroxidase gene AK333699 among *Triticum* L. species. Phylogenetic comparison showed high homology of anionic peroxidase genes of *Triticum aestivum* L. and *T. compactum* Host (97,1%), but the lowest with *T timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. (94,1%). Sequenced anionic peroxidase gene TC151917 of *T. aestivum* has the most homology with peroxidase of *Hordeum vulgare* L. (AK249487.1 – 93% and AK249784.1 – 90%), *Oryza sativa* L. (D84400 – 82%, BN000655 – 82% and V14481 – 80%), *Sorghum bicolor* (L.) Moench (XM\_002447101.1 – 80%) and *Zea mays* L. (NM\_001147217.1 – 79% and EU974071.1 – 78%). Thus, the described above peroxidase in related plant species can be identified as a particular cluster of polysaccharide-specific isoperoxidases.

**Key words:** wheat, *Triticum* and *Aegilops* species, gene of peroxidase.

### Введение

Гены, кодирующие класс III пероксидаз, присутствуют у всех наземных растений. Многие исследователи предполагают, что их эволюционное формирование связано с адаптацией растений к наземной жизни в присутствии кислорода (Kawano et al., 2003; Passardi et al., 2005). В геномах растений пероксидазы кодируются десятками генов (Liu et al., 2005). Так, в секвенированных геномах арабидопсис и риса обнаружено соответственно 73 и 138 генов пероксидаз (Passardi et al., 2004; Liu et al., 2005). Судя по представленной в международных генетических банках информации о структуре генов, кодирующих пероксидазы класса III, можно отметить, что она характеризуется значительной гетерогенностью (Hiraga et al., 2001; Passardi et al., 2007). Причем относительно высокой

гомологией могут обладать пероксидазы из эволюционно отдаленных видов растений (Bacalovic et al., 2006).

На фоне активного изучения физиологических функций пероксидазы роль структуры белковой части ее молекулы, тесно связанной с генетической составляющей, и последующее проявление растениями устойчивости к патогенам пока остается слабо изученной (Almagro et al., 2009; Penel et al., 2009). Также остается ограниченной информация об их полиморфизме, экспрессионной чувствительности к воздействию стрессовых факторов и физиологических функциях отдельных изоферментов. Например, нами показано, что из множества пероксидаз мягкой пшеницы только анионные изоформы с изоэлектрической точкой 3.5 способны к ионообменной сорбции на хитин, компонент клеточных стенок патогенных грибов (Maksimov et al., 2005). Цель данной работы – сравнительный анализ полиморфизма фрагмента гена пероксидазы TC151917 пшеницы, предположительно кодирующего анионную хитин-специфичную изопероксидазу, а также гомологичных пероксидаз других видов растений.

## Материалы и методы

Работа проводилась с использованием ДНК разных видов растений из полиплоидного ряда пшениц (род *Triticum* L.) и эгилопс (род *Aegilops* L.). Семена из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им. Н. И. Вавилова (ВИР, г. Санкт-Петербург) были любезно предоставлены д. б. н. О. П. Митрофановой и к. б. н. Н. Н. Чикидой. В работе были использованы следующие виды трибы *Triticeae* Trin. ex Griseb.: *T. compactum* Host (к-30052), *T. durum* Desf. (к-21539), *T. × fungicidum* Zhuk. (к-43065), *T. macha* Dekapr. et Menabde (к-28198), *T. monococcum* L. (к-46753), *T. petropavlovskiyi* Udacz. et Migusch. (к-51764), *T. spelta* L. (к-20382), *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. (к-29539), *T. urartu* Thum. ex Gandiljan (к-58496), *T. boeoticum* Boiss. (к-59168), *Aegilops sharonensis* Eig (к-652), *Ae. tauschii* Coss. (к-285).

Выделение общей РНК проводили с использованием тризола, согласно протоколу фирмы-поставщика («Molecular Research Center, Inc.», США), из проростков, корней или листьев растений, зафиксированных в жидком азоте. Реакцию обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) проводили в 20 мкл общего объема смеси, содержащей 10 мкг общей РНК, 1 мкл M-MLV обратной транскриптазы («Fermentas», Литва), 9 мкл 1× буфера M-MLV («Fermentas», Литва) для обратной

транскрипции, 32 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мкл олигонуклеотидных праймеров, по 5 мкл 1.25 мМ dNTP. Отжиг праймеров на матрице РНК проводили в течение 5 мин при 65°C, а построение кДНК по матрице РНК в течение 1 ч при 37°C. Полученную кДНК использовали в реакции амплификации. ПЦР проводили в амплификаторе типа ТП4-ПЦР-01-Терцик («ДНК-Технология», Россия) с использованием праймеров, специфичных к фрагменту гена, кодирующему полисахарид-связывающую пероксидазу TC151917 (<http://peroxidase.isb-ib.ch>), которая идентична нуклеотидной последовательности к ДНК пероксидазы *T. aestivum* (номер доступа в генбанке AK333699.1). После амплификации фрагменты ДНК фракционировали методом электрофореза в 1–2% агарозном геле или 7% ПААГ в электрофоретической камере S2 («Хеликон», Россия). В качестве маркеров использовали маркеры MassRuler DNA Ladder, Low Range («Fermentas», Литва).

ПЦР-продукты фрагмента гена пероксидазы были выделены из геля при помощи набора для очистки ДНК (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург) и секвенированы с использованием автоматического секвенатора ДНК модели ABI PRISM 310 фирмы «Applied Biosystems» (США) наборами для секвенирования «Big Dye Terminator v.3.0», следуя протоколу и рекомендациям изготовителя. Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов генов пероксидаз из разных видов трибы *Triticeae* депонированы в ГенБанк: *T. compactum* Prx (HQ317990.1), *T. durum* Prx (HQ317988.1), *T. fungicidum* Prx (HQ317989.1), *T. macha* Prx (HQ317994.1), *T. monococcum* Prx (HQ317991.1), *T. petropavlovskii* Prx (HQ317997.1), *T. spelta* Prx (HQ317993.1), *T. timopheevii* Prx (HQ317992.1), *T. urartu* Prx (HQ317996.1), *Ae. sharonensis* Prx (HQ317998.1), *Ae. tauschii* Prx (HQ317999.1). Поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей генов осуществляли с помощью программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) в базе данных Gene Bank Национального центра биотехнологической информации США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Компьютерный анализ предполагаемых нуклеотидных и аминокислотных последовательностей фрагмента гена пероксидазы осуществляли с помощью программы DNASIS, а также пакета программ Lasergene 5.5 фирмы «DNASTAR, Inc»». Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили, используя алгоритм ClustalW (Passardi et al., 2007). Для построения «филогенетических деревьев» использовали метод «объединения соседей» Neighbor-Joining (NJ).

## Результаты и обсуждение

Пероксидаза как фермент, крайне необходимый для нормального функционирования растительной клетки, конститутивно синтезируется в растении и представлен множественностью изоформ. Пероксидазы, контролируя уровень АФК, способствуют развитию ранних реакций сигнализации процессов гибели клеток как на абиотический, так и биотический стресс, определяя, таким образом, формирование адаптивного потенциала растений.

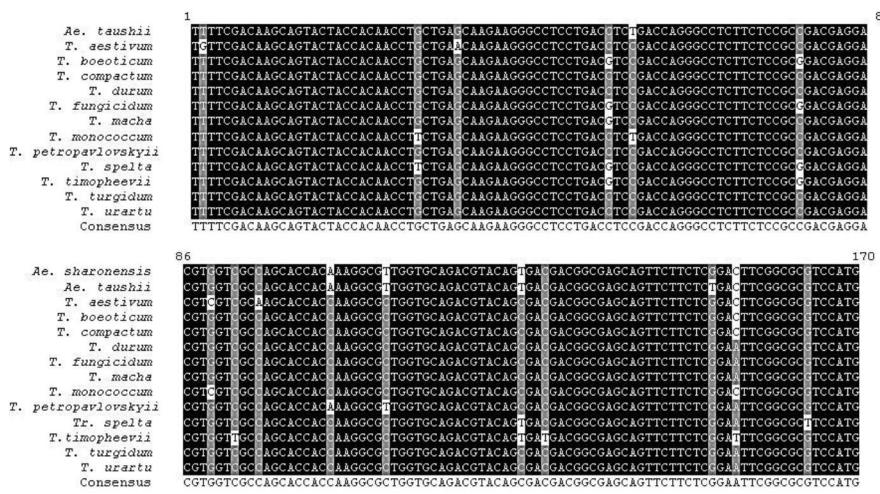
Известно, что олигомеры хитина, являясь высокоэффективными элиситорами защитных реакций, повышают активность некоторых изопероксидаз (Blee et al., 2003; Cosio et al., 2009), которые, как показано, являются одними из ключевых защитных белков, формирующих вокруг инфекционной структуры патогенов полимерный слой лигнина. Предполагается, что такой эффект связан со способностью некоторых изопероксидаз взаимодействовать с хитином клеточных стенок грибных патогенов (Maksimov et al., 2005). Исследователями из Женевского университета (Швейцария) с использованием молекулярных методов была определена трехмерная структура фермента пероксидазы с электростатически активными сайтами и последовательность аминокислотных остатков, которая обуславливает взаимодействие пероксидаз с полисахаридами (Carpin et al., 2001). Вероятно, эти изопероксидазы, благодаря способности взаимодействовать с полисахаридами (Dunand et al., 2002; Schweikert et al., 2002), обеспечивают направленное отложение лигнина в зоне инфицирования и являются одним из важных ферментов, участвующих в защитных функциях растений против патогенов.

На основе сравнения предсказанных аминокислотных последовательностей фрагмента гена, анионной изопероксидазы *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ATg08770, определяющего взаимодействие ее с полисахаридами (Carpin et al., 2001) с известными последовательностями этих генов из других представителей трибы *Triticeae* был отобран участок гена *T. aestivum* L. TC151917 (<http://peroxidase.isb-ib.ch>), идентичный фрагменту кДНК пероксидазы *T. aestivum* (номер доступа в генбанке AK333699.1). К полисахарид-специальному участку данного гена пероксидазы были подобраны праймеры.

Представители родов *Triticum* и *Aegilops* были модельными растениями, которые мы использовали для определения вариабельности

фрагмента гена, кодирующего содержащий полисахарид-специфичный домен изопероксидазы.

Нами были секвенированы фрагменты генов, кодирующие полисахарид-специфичный домен пероксидаз, разных видов пшениц: *T. aestivum*, *T. boeticum*, *T. compactum*, *T. durum*, *T. fungicidum*, *T. macha*, *T. monococcum*, *T. petropavlovskyi*, *T. spelta*, *T. turgidum*, *T. urartu*, *T. timopheevii* – и *Ae. taushii*. В нуклеотидной последовательности этих фрагментов обнаружена открытая рамка считывания, не нарушающаяся по всей длине фрагмента и не содержащая инtronов (рис. 1). Выявлена максимальная гомология данного участка гена пероксидазы TC151917 мягкой пшеницы с таковым у *T. compactum* (97,1%) и минимальная – с участком *T. timopheevii* (94,1%). Сравнение предсказанных аминокислотных последовательностей секвенированных фрагментов пероксидаз разных видов пшеницы и эгилопс с последовательностью из генетического банка данных NCBI АК333699.1 не выявило заметных отличий, что говорит о его консервативной структуре для рода *Triticum* (рис. 2).

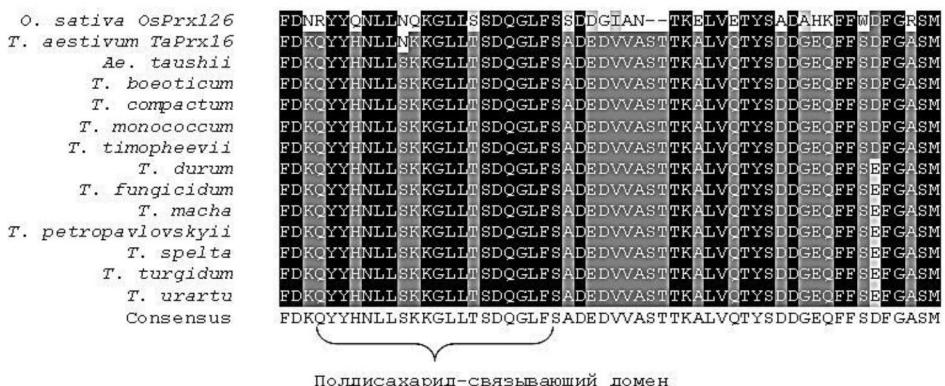


**Рис. 1. Гомология нуклеотидных последовательностей пероксидаз у разных видов пшениц и эгилопс**

Подсчет количества нуклеотидных замен в полисахарид-специфичном домене гена пероксидазы показал, что у всех изученных

видов пшениц и эгилопс происходила замена аспарагина (амидная группа) на серин (гидроксильная группа) (сайт 260) по сравнению с *T. aestivum*. Эта позиция находится в вариабельном участке белка, находящимся в непосредственной близости от потенциального полисахарид-связывающего сайта, поэтому выявленный полиморфизм может определять эффективность сорбции на полисахаридах клеточной стенки патогена, такие как, например, хитин.

Второй сайт нуклеотидного полиморфизма (сайт 300) обуславливает диморфизм в сигнальном пептиде белка. У *T. durum*, *T. fungicidum*, *T. macha*, *T. petropavlovskyi*, *T. spelta*, *T. turgidum*, *T. urartu* происходит замена аспарагиновой кислоты на глутаминовую. Обе аминокислоты имеют карбоксильные группы и несут отрицательный заряд, поэтому этот полиморфизм функционально не значим. Таким образом, при сравнении с *T. aestivum* – по одной несинонимичной замене обнаружено у *T. boeoticum*, *T. compactum*, *T. spelta*, *T. timopheevii*, *Ae. taushii*, и по две – у *T. durum*, *T. fungicidum*, *T. macha*, *T. monococcum*, *T. petropavlovskyi*, *T. turgidum*, *T. urartu*.



Примечание: идентичные и полуконсервативные нуклеотидные последовательности обозначены черным и светло-серым цветами соответственно, нуклеотидные замены – белым фоном.

**Рис. 2. Гомология предсказанных аминокислотных последовательностей в полисахарид-связывающей зоне пероксидазы у разных видов пшениц и эгилопс, в сравнении с соответствующим фрагментом гена пероксидазы *OsPrx126* риса**

Известно, что в становлении полиплоидных видов пшениц участвовали три генома (B, G, D) рода эгилопс и лишь один геном (A) собственно пшеничный (Dorofeev et al., 1987). Сравнительный анализ предсказанных аминокислотных последовательностей секвенированных фрагментов генов пероксидаз показал связь между степенью гомологии полисахарид-специфичных доменов пероксидаз и уровнем эволюционного родства геномов изученных видов пшениц и эгилопс.

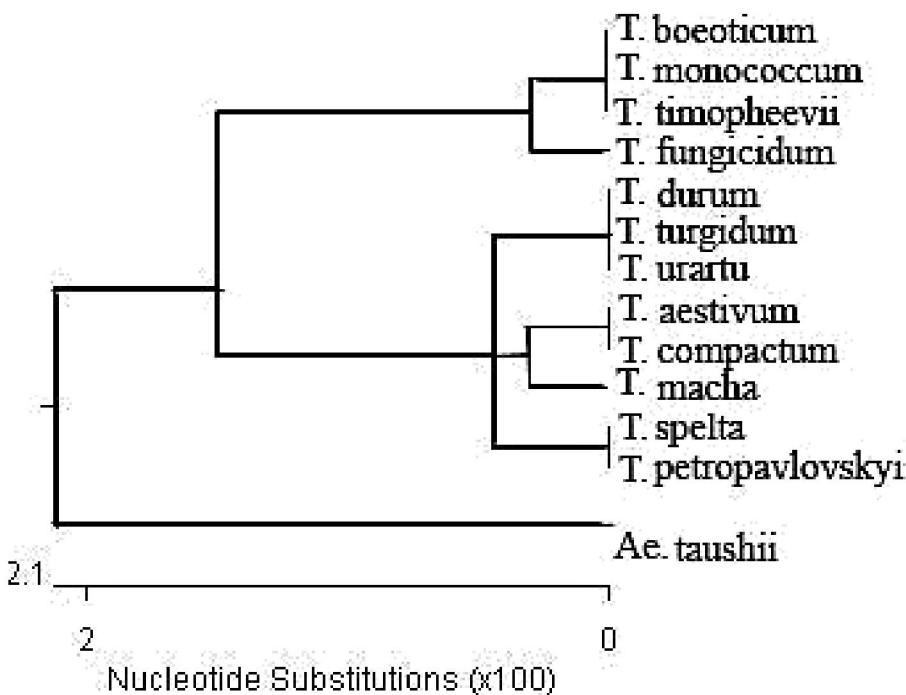
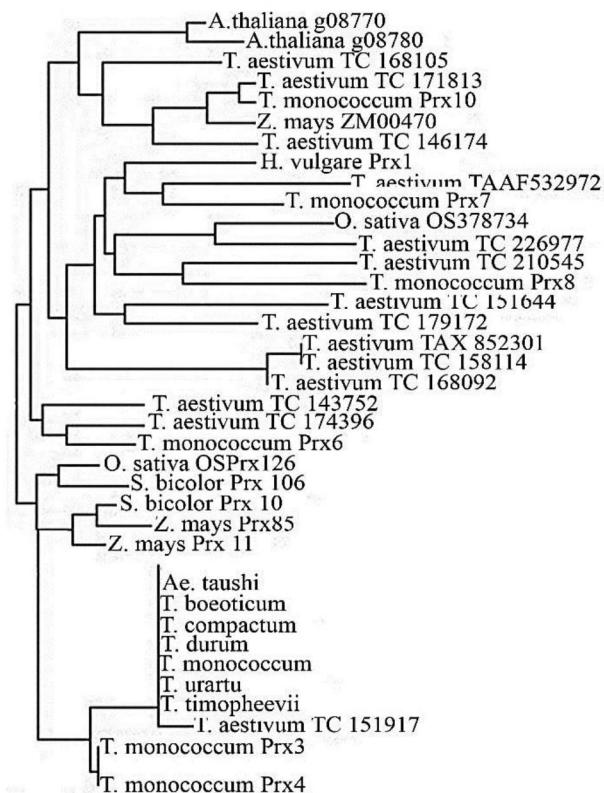


Рис. 3 Древо, построенное на основе анализа секвенированных нуклеотидных последовательностей пероксидаз видов рода *Triticum*, содержащих полисахарид-специфичный домен

Как видно из рисунка 3, компьютерная программа, анализирующая гомологичность генов и учитывающая синонимичные и несинонимичные нуклеотидные замены, выделила виды *T. compactum*, *T. durum*, *T. macha*, *T. spelta*, *T. turgidum*, *T. urartu* и *T. aestivum* (носители геномов A<sup>4</sup>), относящиеся к подроду *Triticum*, в отдельный кластер. В то же время виды *T. boeoticum*, *T. monococcum*, *T. timopheevii*, относящиеся к видам

подрода Boeoticum и являющиеся носителями геномов A<sup>b</sup>, оказались в другом. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена пероксидазы эгилопса *Ae. taushii* – носителя генома D – находится на рисунке относительно обособленно. Таким образом, изученные фрагменты генов пероксидаз образовали филогенетически связанные группы, которые соответствуют ранее выдвинутым предположениям об эволюционных отношениях между видами пшениц и эгилопса (Dorofeev et al., 1987; Goncharov et al., 2008). Обособленность расположения гена *Ae. taushii*, по всей видимости, предполагает, что в реализации его экспрессии в растениях пшеницы наибольшую роль играют копии, гомологичные генам *T. urartu* и *T. boeoticum*.



**Рис. 4. Сравнение генов пероксидаз разных видов злаковых и арабидопсис с секвенированными последовательностями, кодирующими полисахарид-специфичный домен**

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента исследуемого гена пшеницы *TC151917* и генов изопероксидаз

арабидопсис, а также видов, относящихся к злаковым (рис. 4), отобранным для работы из базы данных NCBI, выявил, соответственно, наибольшую гомологию анализированных нами фрагментов генов пероксидаз с близкими по структуре генов пероксидаз ячменя *Hordeum vulgare* (AK249487.1 – 93% и AK249784.1 – 90%), риса *Oryza sativa* (D84400 – 82%, BN000655 – 82% и B14481 – 80%), сорго *Sorghum bicolor* (XM\_002447101.1 – 80%), кукурузы *Zea mays* (NM\_001147217.1 – 79% и EU974071.1 – 78%). Как видно, секвенированные нами фрагменты, гомологичные гену *TC151917* мягкой пшеницы *Triticum aestivum*, ряда видов злаковых выделились в отдельный кластер, представители которого, вероятно, также способны к взаимодействию с полисахаридами. Полученные нами данные позволяют говорить о наличии группы генов, кодирующих отдельный подкласс полисахарид-специфичных изоформ пероксидаз.

### Заключение

Пероксидаза является одним из растительных ферментов, характеризующихся широкой функциональной активностью, в том числе и защитной (Passardi et al., 2005). Важное ее свойство – активное включение в защитные механизмы против патогенов (Pshenichnov et al., 2011). В данной работе показано, что за полисахарид-специфичность некоторых изопероксидаз пшеницы, которая способствует их взаимодействию с клетками патогенных грибов, несет ответственность домен, расположенный между 243 и 269 остатками аминокислот.

Анализ генетической близости секвенированных фрагментов разных видов пшениц обнаружил, что этот домен характеризуется сходной организацией внутри рода пшениц. При этом полученные после секвенирования ДНК данные по нуклеотидным заменам в искомой последовательности показали четкое разделение видов пшениц на два отдельных кластера, соответствующих их геномному распределению. Результаты этой работы согласуются с известными из литературных источников данными о делении рода *Triticum* на два подрода: *Bgeoticum* и *Triticum*. Таким образом, секвенированные фрагменты, гомологичные гену *TC151917* пероксидазы *T. aestivum* (код доступа AK333699.1), и подобные мотивы пероксидаз у родственных видов растений можно выделить в отдельный кластер полисахарид-специфичных изопероксидаз, которые, вероятно, могут взаимодействовать с хитином фитопатогенных

грибов и запускать защитные механизмы растения в ответ на инфицирование.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Госконтракт 14.604.21.0016) (уникальный идентификатор (RFMEFI60414X0016) на оборудовании ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

## Литература/References

- Almagro L., Gomez Ros L. V., Belchi-Navarro S. et all. Class III peroxidases in plant defence reactions // J. Exp. Botany. 2009. Vol. 60. P. 377–390.*
- Bacalovic N., Passardi F., Ioannidis V. et all. PeroxiBase: A class III plant peroxidase database. // Phytochemistry. 2006. Vol. 67. P. 534–539.*
- Blee K. A., Choi J. W., O'Connell A. P. et all. A lignin-specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification // Phytochemistry, 2003. Vol. 64. P. 163–176.*
- Carpin S., Crevecoeur M., Meyer M. et all. Identification of a Ca<sup>2+</sup>-pectate binding site on an apoplastic peroxidase // Plant Cell. 2001. Vol. 13. P. 511–520.*
- Cosio C., Vuillemin L., Meyer M. et all. An anionic class III peroxidase from zucchini may regulate hypocotyl elongation through its auxin oxidase activity // Planta, 2009. Vol. 229. P. 823–836.*
- Doroфеев V. F., Удачин R. A. et all. Wheats of the World // Leningrad: Kolos, 1987. 560 p. (in Russian)*
- Dunand C., Tognelli M., Meyer M. et all. Identification and Characterization of Ca — Pectate Binding Peroxidase in *Arabidopsis thaliana* // Journal of Plant Physiology. 2002. Vol. 159. P. 1165–1171.*
- Goncharov N., Kondratenko E. Origin, domestication and evolution of wheat // The Vavilov Journal of Genetics and Breading, 2008. Vol. 12. N 1, 2. P. 159–179. (in Russian)*
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H. et all. A large family of class III plant peroxidases // Plant Cell Physiol., 2001. Vol 42. P. 462–468.*
- Kawano T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction // Plant Cell Rep. 2003. Vol. 21. P. 829–837.*
- Liu G., Sheng X., Greenshields D., Ogieglo A. Profiling of wheat class III peroxidase genes derived from mildew-attacked epidermis reveals distinct sequence-associated expression patterns. // Molecular Plant-Microbe Interaction. 2005. Vol. 18. P. 730–741.*

- Maksimov . V., Cherepanova E. A., Yarullina L. G., Axmetova I. E.* Isolation of chitin-specific wheat oxidoreductases // Applied Biochemistry and Microbiology. 2005. Vol. 41, N 6. P. 616–620. (in Russian)
- Passardi F., Penel C., Dunand C.* Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. // Plant Science. 2004. Vol. 9. P. 534–540.
- Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunand C.* Peroxidases have more functions than a Swiss army knife // Plant Cell Rep. 2005. Vol. 24. P. 255–265.
- Passardi F., Theiler G., Zamocky M. et all.* PeroxiBase: the peroxidase database // Phytochemistry. 2007. Vol. 68. P. 1605–1611.
- Penel C., Van Cutsem P., Greppin H.* Interactions of a plant peroxidase with oligogalacturonides in the presence of calcium ions // Phytochemistry. 1999. Vol. 51. P. 193–198.
- Penel C., Dunand C.* Signaling via Plant Peroxidases. In: Baluška F, Vivanco J, Eds. Signaling in Plants: Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- Pshenichnov E., Khashimova N., Akhunov A. et all.* Participation of Chitin-Binding Peroxidase Isoforms in the Wilt Pathogenesis of Cotton // American Journal of Plant Sciences. 2011. Vol. 2. P. 43–49.
- Schweikert C., Liszkay A., SchopherP.* Polysaccharide Degradation by Fenton Reaction- or Peroxidase- Gene-Rated Hydroxyl Radicals in Isolated Plant Cell Walls // Phytochemistry. 2002. Vol. 61. P. 31–35.
- Shah K., Penel C., Gagnon J., Dunand C.* Purification and identification of a Catechate binding peroxidase from *Arabidopsis* leaves // Phytochemistry. 2004. Vol. 65. P. 307–312.